

## **Micropropagação de morangueiro (*Fragaria X ananassa* Duch) em resposta a diferentes concentrações de Metatopolina.**

Catarina Corrêa Puttkammer<sup>(1)\*</sup>, Ramon Felipe Scherer<sup>(2)</sup>, Miguel Pedro Guerra<sup>(3)</sup>

<sup>1</sup> Graduanda do Curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, bairro Itacorubi, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup> Pesquisador Doutor da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Estação Experimental de Itajaí. Rodovia Antônio Heil, de 6002 a 12000, lado par Itaipava, 88318-112, Itajaí, SC, Brasil.

<sup>3</sup> Professor Titular do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, bairro Itacorubi, CEP: 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil.

\*Autor Correspondente: cputtkammer@gmail.com

### **Resumo**

Na produção de mudas de morangueiro é recomendada utilização de plantas matrizes oriundas da cultura de tecidos. Dessa forma tem sido estudados métodos para o aperfeiçoamento da técnica de micropropagação desta espécie. A escolha de fitorreguladores é essencial para o estabelecimento de protocolos de micropropagação. A N6-(*meta*-hidroxibenzil)adenina, conhecida como metatopolina (mT), é um fitorregulador do grupo das topolinas, que se difere de outras citocininas devido a aspectos bioquímicos, receptores e atividade biológica. No presente trabalho, testaram-se diferentes concentrações de mT na indução e multiplicação de culturas nodulares de morangueiro. Testaram-se também diferentes concentrações iônicas de formulação salina MS, o carvão ativado, o Ácido Indobutírico (AIB) e tampas com trocas gasosas na fase de alongamento e enraizamento de brotos. A formação de brotos em meios de cultura com mT foi alta, principalmente na concentração de 5 µm. Para o alongamento de brotos o melhor meio de cultura foi MS com concentração plena, acrescido de carvão ativado. O AIB teve efeito negativo para número de brotos e raízes, quando não combinado ao carvão ativado. Os resultados obtidos não evidenciaram diferenças para os parâmetros avaliados em resposta ao uso de tampas com trocas gasosas e sem trocas gasosas.

**Palavras-chave:** micropropagação, morangueiro, metatopolina.

**Micropropagation of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) in response of different concentrations of Metatopolin.**

**Abstract**

In the production of strawberry stock plants it is recommended the use of micropropagated mother plants. Because of this it has been studied methods to improve the micropropagation technique of this species. The plant growth regulator choice is essential for establishment of micropropagation protocols. The N6-(*meta*-hydroxybenzyl)adenine, called meta-topolin (mT), is a synthetic cytokinin derived from topolin group, being different from the other cytokinins because of biochemical aspects, and biological activity. In the present work it was evaluated the effects of mT in the induction and development of nodule cluster of strawberry as well as the use of different levels of MS salts formulation, active charcoal, IBA, and lids with or without gas exchange in the elongation and rooting phase of micropropagation. The highest rate of shoots development resulted from mT at 5 µm. For shoot elongation the best culture medium was MS full strength active charcoal. IBA has negative effect on number of shoots and roots, in medium without activated charcoal. The use of lids with gas exchanges wasn't different from lids without gas exchanges for the evaluated parameters.

**Key words:** Micropropagation, strawberry plants, metatopolin.

**Introdução**

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) é uma planta herbácea estolonífera da família das rosáceas. Possui caule semi-subterrâneo e folhas trifoliadas que se originam de forma helicoidal. Os estolões são originados a partir de gemas basais da folha e crescem sobre a superfície do solo possuindo a capacidade de emitir novas raízes e dar origem a novas plantas, sendo eles a principal forma de propágulo da espécie. O morangueiro possui flores hermafroditas com pétalas brancas ou avermelhadas, e o receptáculo floral, após a fecundação, forma o fruto. Este, é formado basicamente pelo pseudofruto (receptáculo floral desenvolvido), porém os frutos verdadeiros, pequenos aquênios, ficam sobre o receptáculo proeminente (Hoffmann e Bernardi, 2006).

O cultivo do morangueiro gera alta rentabilidade aos agricultores. Por sua vez, os consumidores também possuem amplo conhecimento sobre esta fruta, em parte pelas suas diferentes formas de processamento e utilização, seja *in natura* ou na forma de compotas, geleias, sorvetes, polpas e sucos (Facchinello et al, 2011).

O Brasil não está entre os maiores produtores de morango no mundo (FAO, 2015). Entretanto nos últimos anos, a produção desta fruta vem se tornando cada vez mais expressiva devido as condições ambientais propícias para o cultivo e por produzir durante todo o ano (Dalagnol, 2010). O maior produtor de morango no Brasil é o Estado de Minas Gerais, com 95% da sua produção concentrada na região sul devido as características edafoclimáticas que favorecem o cultivo (Silveira e Guimarães, 2014). Santa Catarina se caracteriza por ter agricultura predominantemente familiar e não possui produção expressiva de pequenas frutas, sendo seu mercado suprido por outros estados. Dessa forma Nesi, Verona e Grossi (2008) realizaram um levantamento a cerca da produção catarinense de morango no ano de 2006 verificando o cultivo em 29 municípios, envolvendo 363 produtores e uma área de 128,6 ha com produtividade média de 28,4 t/ha variando entre 12 e 60 t/ha de acordo com o clima da região e o sistema de cultivo. A produção se concentra nos municípios de Rancho Queimado, Águas Mornas e Água Doce, que juntos somam 78,5% da área total com morango no estado.

Devido à necessidade de alta qualidade de produto para a comercialização, exigência do mercado consumidor, é necessário que as mudas sejam de alto padrão e em quantidade suficiente para atender a demanda (Dias et al, 2014). Na produção de mudas de morangueiro é recomendado que sejam adquiridas plantas matrizes oriundas da cultura de tecidos (Antunes e Filho, 2005). Esta técnica permite a produção massal de mudas com alta qualidade genética e fitossanitária, atendendo as exigências e padrões necessários para a produção de matrizes de morangueiro (Dias et al, 2014).

O relato inicial de micropropagação *in vitro* de morangueiro foi feito por Boxus em 1974, a partir da multiplicação de brotos axilares, e continua sendo utilizado com sucesso (Debnath, 2008). A partir de então tem sido estudados diferentes combinações de fitorreguladores e diferentes explantes iniciais para o aperfeiçoamento da técnica e obtenção de maior número de brotos com menor variação somaclonal. Neste sentido, comumente se utiliza a 6-Benzilaminopurina (BAP) combinada a outros fitorreguladores para indução da formação de brotos, tais como ácido indolbutírico (AIB) (Hanhineva, Kokko e Kärenlampi, 2005; Zhang, Folta e Davis, 2014), 2,4-D (Nehra, Stushnoff e

Kartha, 1990; Omar et al, 2013) e Cinetina (KIN) (Shakila et al, 2007; Bhankher et al, 2008). Porém há também o uso de meio de cultura suplementado apenas com Thidiazuron (TDZ) (Debnath, 2008) ou em combinação com AIB (Hanhineva, Kokko e Kärenlampi, 2005).

Os tipos de explantes utilizados também são diversos: folhas (Nehra, Stushnoff e Kartha, 1990; Hanhineva, Kokko e Kärenlampi, 2005; Mohamed et al, 2007; Debnath, 2008; Omar et al, 2013; Zhang, Foltá e Davis, 2014), pétalas (Debnath, 2008; Omar et al, 2013), sépalas (Debnath, 2008), brotos e meristemas retirados de estolões (Mohamed et al, 2007; Bhankher et al, 2008) e segmentos nodais (Shakila et al, 2007).

As rotas morfogênicas associadas à micropropagação de plantas são a embriogênese somática e a organogênese. Uma terceira rota morfogênica recentemente caracterizada foi denominada de culturas nodulares (CNs). As CNs formam nódulos orgânicos globulares de coloração amarelo-esverdeado translúcido, com textura de friável a levemente compacta e composta por aglomerados de meristemas que em condições de cultura adequadas formam grande quantidade de brotos (Dal Vesco et al, 2011).

Hanhineva, Kokko e Kärenlampi (2005) iniciaram os estudos com uso de biorreatores para a micropropagação de morangueiro, o modelo utilizado foi o RITA<sup>®</sup> com sistema de imersão de 4 minutos a cada 5 horas, testando diferentes hormônios (AIB, TDZ e BAP) e combinações. O melhor resultado obtido pelos mencionados autores foi a utilização do meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 9 µm de TDZ e 2,5 µm de AIB, associados ao RITA<sup>®</sup>. Debnath (2008) também testou o uso de biorreatores do mesmo tipo, porém utilizando meio de cultura BM suplementado com concentrações que variam de 0,2 a 4 µm de TDZ e 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e diferentes explantes (pétalas, sépalas e folhas), constatando o maior número de brotações no meio com 4 µm de TDZ.

Variações somaclonais são indesejáveis em mudas comerciais e a escolha de fitorreguladores adequados é essencial para o estabelecimento de protocolos de micropropagação (Amoo, Finnie e Van Staden, 2011). Assim, cada vez mais são estudadas citocininas que apresentem menor influência nas anormalidades, visando a otimização de protocolos de micropropagação (Aremu et al, 2012).

Strnad et al (1997), relataram a existência de uma citocinina aromática com alta função de regulação de crescimento em plantas de álamo, a N6-(*meta*-hidroxibenzil)adenina, comumente chamada de meta-topolina (mT). Este fitorregulador

pertence ao grupo das topolinas, encontradas naturalmente em plantas, se diferem de outras citocininas (como a zeatina) devido a aspectos bioquímicos, receptores e atividade biológica. A diferença entre as moléculas de BAP e mT é de apenas uma hidroxila ligada na posição meta ao anel aromático da cadeia lateral (Strnad et al, 1997).

Amoo, Finnie e Van Staden (2011), em estudo realizado com *Barleria greenii*, uma planta ornamental, avaliaram a influência de BAP, KIN e diferentes topolinas, entre elas a mT, sobre anormalidades e produção de brotos. Os resultados demonstram que não há diferença estatística entre mT e BAP quanto a produção de brotos e comparando concentrações equimolares se percebe que há menor observação de anormalidades nos brotos expostos a mT em relação ao BAP, principalmente em concentrações mais elevadas.

O objetivo do presente trabalho foi o de estabelecer um protocolo de micropropagação de morangueiro por meio da indução e desenvolvimento de culturas nodulares com o uso de Metatopolina, bem como testar os efeitos do AIB, carvão ativado e tampas com trocas gasosas na fase de alongamento e enraizamento de brotos.

## **Material e Métodos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC) de dezembro de 2014 a agosto de 2015.

### **Indução das culturas**

Para a indução das culturas, foram utilizados explantes foliares com dimensões aproximadas de 10 x 2 mm, seccionados longitudinalmente de folhas jovens de três cultivares de morangueiro (Camarosa, Oso Grande e Pircinque). As folhas foram coletadas a partir de plantas cultivadas em sistema hidropônico no CCA/UFSC. Essas folhas foram lavadas em água corrente e, em câmara de fluxo laminar, passaram por assepsia em álcool 70% com 2 gotas de Twin<sup>®</sup>20 por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 1% com 1 gota de Twin<sup>®</sup>20 por 12 minutos e tríplice lavagem com água destilada esterilizada.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (150x25 mm) contendo 15 mL de meio de cultura com solução salina MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951) e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, o pH foi ajustado para 5,8. Para a indução morfogenética das culturas nodulares foram testadas diferentes concentrações de mT (2,5, 5, 10 µM) combinadas com 2,5 µM AIB. Foi utilizada uma

testemunha positiva com TDZ 9  $\mu\text{M}$  combinado de AIB 2,5  $\mu\text{M}$  e uma testemunha negativa, meio isento de fitorreguladores. Foram utilizados 9 tubos de cada tratamento, contendo 2 segmentos foliares cada um, sendo cada segmento uma repetição.

Após a inoculação, as plantas foram transferidas para sala de crescimento a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , permaneceram na ausência de luz por 7 dias e então, foram expostas a um fotoperíodo de 16h, com intensidade luminosa de  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Após 30 dias foram avaliadas a formação ou não de culturas nodulares nas rotas morfogenéticas direta e indireta.

A formação de culturas nodulares foi avaliada aos 30 dias, após a inoculação dos explantes, utilizando o teste  $\chi^2$  em tabela de contingência, através da utilização do software SAS<sup>®</sup> 9.3.

### **Manutenção e Multiplicação das culturas**

As culturas foram mantidas e multiplicadas em meios de cultura com a mesma formulação a qual foram expostos na indução e ficaram sob aquelas condições de luminosidade e temperatura, após a primeira semana de indução. Na terceira repicagem, as culturas que apresentaram maior desenvolvimento de culturas nodulares, foram transferidas para biorreatores do tipo RITA<sup>®</sup> em meio líquido contendo a mesma combinação de fitorreguladores do meio do qual se originam. Da mesma forma, o desenvolvimento das culturas em biorreatores foi sob as mesmas condições de iluminação e temperatura. O sistema de imersão foi regulado em um regime de 5 minutos a cada 3 três horas. Os brotos permaneceram em biorreatores por 3 meses.

### **Alongamento e Enraizamento de brotos**

Brotos desenvolvidos no biorreator RITA<sup>®</sup>, em meio com 5  $\mu\text{M}$  de mT e 2,5  $\mu\text{M}$  de AIB, foram transferidos novamente para frascos de imersão permanente (12,5 x 6 cm) contendo 25 ml de meio de cultura gelificado. O meio de cultura básico foi constituído pela formulação salina MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951) e 30 g l<sup>-1</sup> de sacarose, o pH foi ajustado para 5,8. Foi realizado um experimento trifatorial: ausência ou presença de fitorregulador (0 ou 5  $\mu\text{M}$  de AIB); ausência ou presença de carvão ativado (0 ou 1,5 g/L de carvão ativado) e força da formulação salina MS (metade da formulação salina MS ou concentração total da formulação salina MS). Em cada frasco foram colocados inicialmente 5 brotos

individualizados e, após 4 semanas de desenvolvimento foi avaliado: a altura média dos brotos; o número médio de brotos; o número médio de raízes e o tamanho médio de raízes.

Ainda na fase de alongamento e enraizamento de brotos, foram selecionados os melhores tratamentos do experimento anterior e estes foram testados em frascos (10 x 5,5 cm) com tampas do tipo biossama (com trocas gasosas) e tampas convencionais (sem trocas gasosas). Após 4 semanas de desenvolvimento foi avaliado: a altura média dos brotos e o número médio de folhas e a porcentagem de oxidação dos brotos.

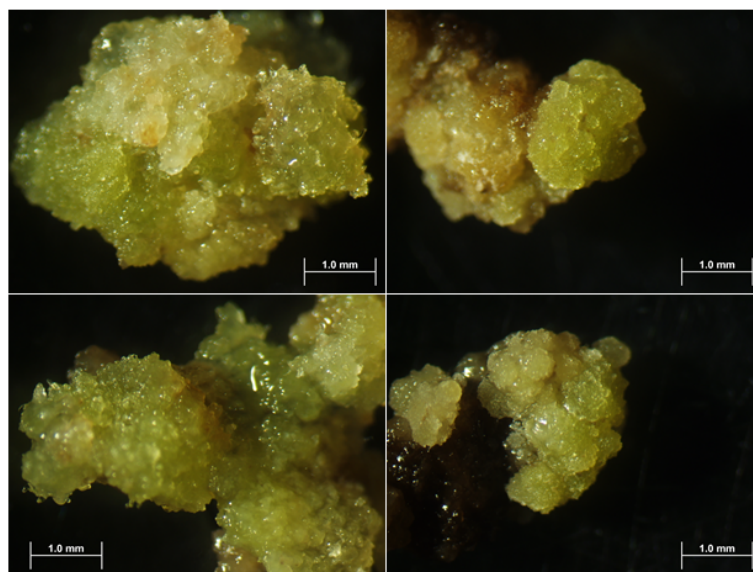
Os dois experimentos desta fase tiveram as suas variáveis avaliadas por análise de variância quando confirmadas a normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias que foram analisadas graficamente (QQ-Plots, gráficos de dispersão e gráficos de resíduos por tratamento). Quando efeitos significantes na análise de variância foram encontrados as médias dentro de cada variável serão comparadas pelo teste de SNK, considerando 95% de confiabilidade, através da utilização do software SAS<sup>®</sup> 9.3..

## **Resultados e Discussão**

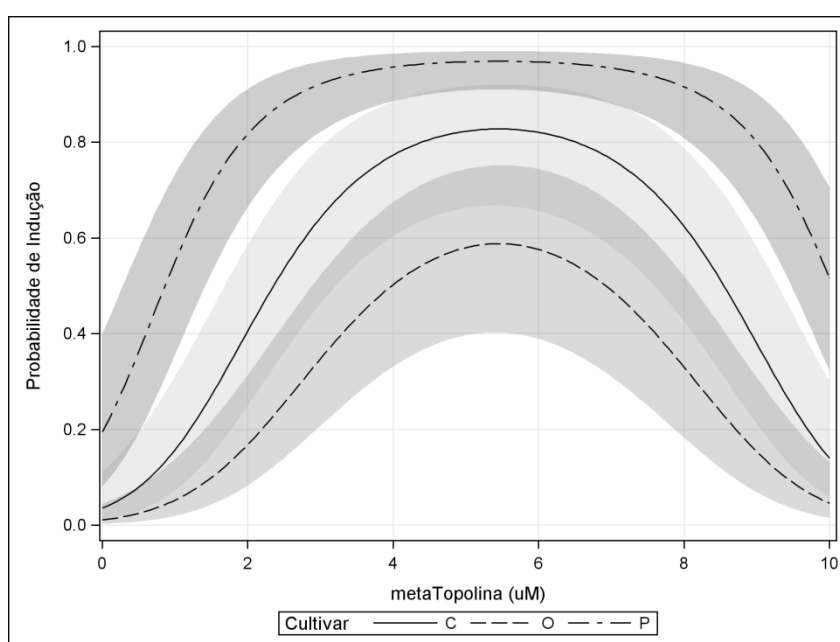
### **Indução**

Após os 30 dias de indução até a diferenciação de brotos as culturas formaram pequenos aglomerados de coloração esverdeada, com aspecto friável, sem a formação de calos nas fases de indução e multiplicação de culturas (Figura 1). Essas culturas foram semelhantes às encontradas por Omar et al. (2013) e Zhang, Folta e Davis (2014) em morangueiro, classificadas como embriogênese somática e também por Scherer et al (2013) em *Ananas comosus* var. *comosus* e Dal Vesco et al (2011), em *Billbergia zebrina* classificadas como culturas nodulares.

A indução das culturas em diferentes meios demonstrou que a melhor concentração de mT para esta fase, nas três cultivares, foi de 5  $\mu$ m. Contudo, a intensidade de indução foi diferente entre as cultivares, sendo que a cultivar Pircinque foi a que melhor respondeu em concentrações mais baixas (2,5  $\mu$ m) e mais altas de mT (10  $\mu$ m) diferindo estatisticamente das demais cultivares quando analisado o intervalo de confiança a 95%. Na concentração de 10  $\mu$ m de mT houve decréscimo na indução, principalmente das cultivares Oso Grande e Camarosa, isso demonstra a relação de genótipo dependência das cultivares quanto aos hormônios utilizados para essa fase do protocolo. As curvas de probabilidade de indução pela concentração de mT pode ser visualizada na Figura 2.



**Figura 1:** Estruturas semelhantes a culturas nodulares formadas após dois ciclos de repicagem de morangueiro (8 semanas após a indução).

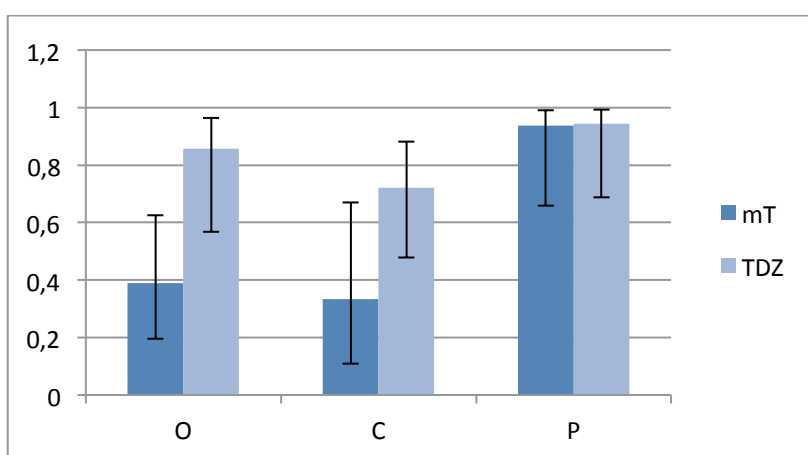


**Figura 2:** Probabilidade de indução de culturas nodulares das cultivares de morangueiro Camarosa (C), Oso Grande (O) e Pircinque(P) nas concentrações de 0 a 10  $\mu\text{m}$  de metatopolina (mT) e 2,5  $\mu\text{m}$  de AIB.

Diversos autores relatam essa relação de genótipo dependência quanto aos fitorreguladores para a indução da micropropagação do morangueiro (Hanhineva, Kokko e Kärenlampi, 2005; Mohamed et al, 2007; Bhankher et al , 2008; Omar et al, 2013). Hanhineva, Kokko e Kärenlampi (2005), testaram diferentes concentrações de



fitorreguladores, utilizando também como explante folhas de morangueiro de cinco diferentes cultivares. Os autores relataram resposta de indução e produção de mudas genótipo-dependentes, sendo a maior taxa de indução em meio de cultura MS com 2,5µm de AIB e 9µm de TDZ. Adicionalmente, os autores utilizaram biorreatores do tipo RITA<sup>®</sup> para a multiplicação e crescimento de brotos. Debnath (2008) relatou que a utilização destes biorreatores com meios suplementados com TDZ na fase de multiplicação de brotos faz com que ocorra a formação de calos, desfavorecendo a formação de mudas comerciais devido ao maior risco de variações somaclonais. Desta forma, utilizou-se o melhor tratamento encontrado por Hanhineva, Kokko e Kärenlampi (2005), meio de cultura MS com 9 µm de TDZ e 2,5 µm de AIB, para comparar com a melhor concentração de mT encontrada no presente trabalho (5 µm de mT e 2,5 µm de AIB) . A mT pode ser um dos substitutos do BAP e a solução para alguns problemas na micropropagação de plantas, pois em concentrações equimolares possui menor toxidez, maior formação de brotos e menor ocorrência de anormalidades (Amoo, Finnie e Van Staden, 2011). Assim, as curvas de probabilidade de indução utilizando TDZ e mT podem ser observadas na figura 3. Nota-se que a resposta é genótipo dependente, isto fica evidenciado tanto para comparações de fitorreguladores diferentes (figura 3), quanto para comparações de diferentes concentrações do mesmo fitorregulador (figura 2). A cultivar Pircinque possui alta probabilidade de indução para os dois fitorreguladores e as demais cultivares possuem menor indução com o uso da mT.



**Figura 3:** Probabilidade de indução de culturas nodulares das cultivares de morangueiro Camarosa (C), Oso Grande (O) e Pircinque (P) nas concentrações de 5 µm de metatopolina (mT) e 9 µm de thidiazuron (TDZ), ambos com 2,5 µm de AIB. A barra de erros representa o intervalo de confiança a 95%.

## **Alongamento e Enraizamento de brotos**

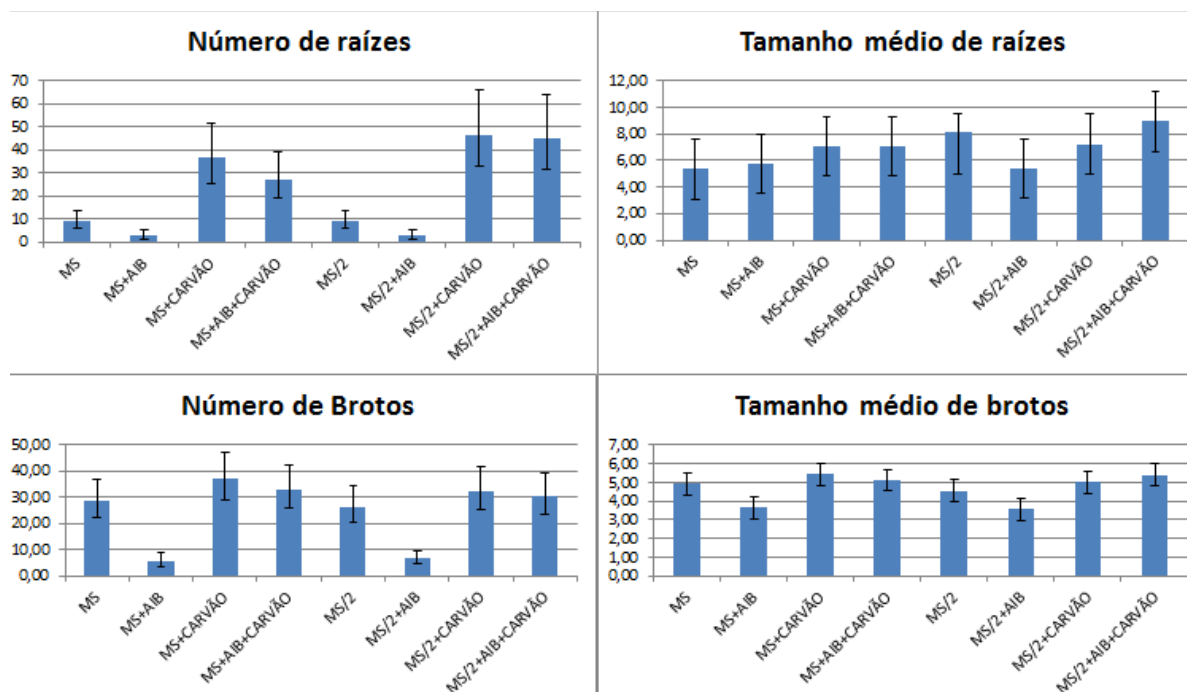
O maior número de raízes, assim como o maior número de brotos foi observado na cultivar Pircinque, em meios de cultura com presença de carvão ativado, sendo que houve a interação entre este fator e a presença ou ausência de AIB. Quando foram utilizados meios somente com AIB houve grande formação de calos e a maioria dos brotos oxidou, o que não ocorreu na presença de carvão ativado, evidenciando a interação demonstrada estatisticamente entre esses dois fatores. O AIB é uma das auxinas mais utilizadas no enraizamento, porém quando utilizada na micropropagação de plantas pode estimular a formação de calos, por este motivo, comumente se realiza o enraizamento *in vitro* sem a adição de fitorreguladores (Grattapaglia e Machado, 1998).

Adak et al (2009) analisaram em seu trabalho o efeito de AIB e carvão ativado na fase de enraizamento da micropropagação de morangueiro cv. Camarosa e relataram um aumento do número e do tamanho das raízes nos tratamentos com carvão ativado. O carvão ativado, além de adsorver compostos inibitórios, possui também a função de deixar o meio de cultura mais escuro (Thomas, 2008), desta forma simula condições de solo, o que pode favorecer a formação de raízes e diminuir o número de oxidação de brotos.

A análise estatística por meio da análise dos intervalos de confiança é apresentada na figura 4. Os tratamentos somente com AIB, tanto no meio com concentração salina total de MS quanto com metade da concentração, reduziram o número de brotos e raízes, diferindo dos demais tratamentos. Por sua vez, a presença do carvão ativado influenciou positivamente a formação de brotos e raízes, principalmente quando combinado ao AIB.

Já para tamanho médio de brotos e raízes não houve interações nem diferenças estatísticas, porém há um pequeno aumento no tamanho de brotos e raízes quando é adicionado carvão ativado no meio de cultura.

A fase de enraizamento depende de diversos fatores endógenos e exógenos, incluindo as características genéticas de cada espécie e cultivar, fazendo com que o estudo da interação entre fatores se torne fundamental para o estabelecimento de protocolos mais eficientes, uma vez que cada fator é estudado isoladamente para uma determinada cultivar e os fatores analisados (Grimaldi et al., 2008).

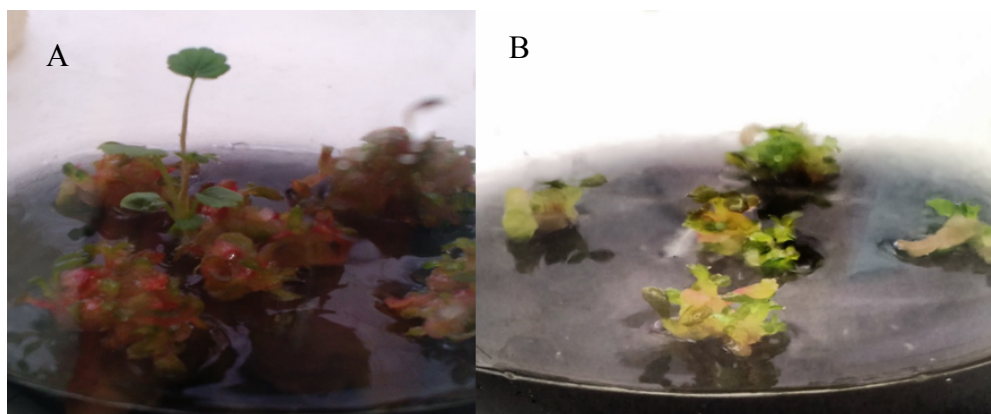


**Figura 4:** Número médio de raízes, tamanho médio de raízes, número médio de brotos e tamanho médio de brotos de morangueiro cv. Pircinque, obtidos através da utilização de AIB (0 ou 5  $\mu\text{m}$ ), carvão ativado (0 e 1,5  $\text{g.L}^{-1}$ ) e força da composição salina MS (concentração plena ou metade da concentração). MS= concentração salina completa, 0  $\mu\text{m}$  de AIB e 0  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão; MS+AIB= concentração salina completa, 5  $\mu\text{m}$  de AIB e 0  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão; MS+Carvão= concentração salina completa, 0  $\mu\text{m}$  de AIB e 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão; MS+Carvão+AIB = concentração salina completa, 5  $\mu\text{m}$  de AIB e 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão; MS/2= metade da concentração salina, 0  $\mu\text{m}$  de AIB e 0  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão; MS/2+AIB= metade da concentração salina, 5  $\mu\text{m}$  de AIB e 0  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão; MS/2+Carvão= metade da concentração salina, 0  $\mu\text{m}$  de AIB e 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão; MS/2+Carvão+AIB metade da concentração salina, 5  $\mu\text{m}$  de AIB e 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão. Barra de erros representa os intervalos de confiança a 95%.

Quanto a força da composição salina, não houveram diferenças estatísticas, porém foi observado que os brotos em meio de cultura com metade da formulação salina MS possuíam coloração de avermelhada a roxa (Figura 5), apesar de terem raízes maiores do que em meios com a formulação salina completa.

Os carboidratos quando não são utilizados no metabolismo do nitrogênio podem participar da síntese de antocianinas, fazendo com que este pigmento se acumule na planta e assim adquira cor arroxeada nas folhas de plantas deficientes em nitrogênio de algumas espécies (Taiz e Zieger, 2013). O nitrogênio influencia significativamente na incidência de folhas vermelhas (Rodas, 2011). A deficiência de nitrogênio se expressa na forma de clorose das folhas mais velhas e, com o avanço dos sintomas, é substituído por uma coloração avermelhada, no cultivo convencional de morango (Rodas, 2008).

A formação de raízes é favorecida quando há a redução da formulação salina nessa fase do protocolo, porém isso varia de acordo com o genótipo testado, sendo favorável a alguns genótipos e não tão favoráveis a outros (Pereira et al, 1999).

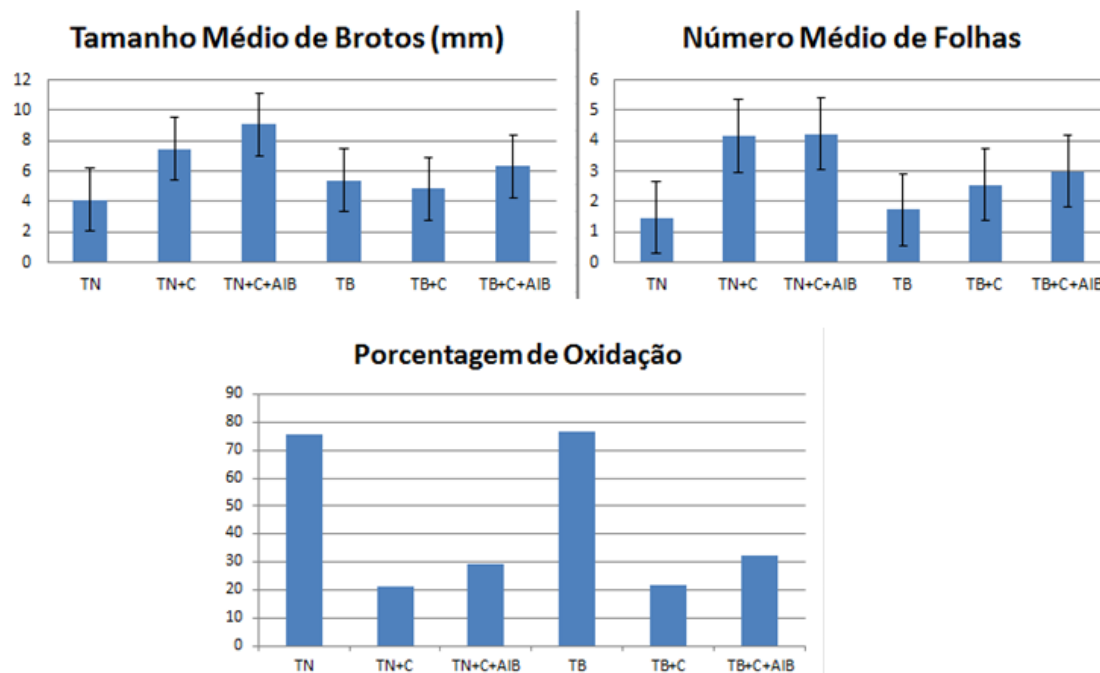


**Figura 5:** Plantas de morangueiro cv. Pircinque obtidas em meio com metade da concentração salina MS (A) e com concentração completa de MS (B).

Frascos com tampas para trocas gasosas (Tampas Biossama) não diferiram estatisticamente dos tratamentos com o uso de tampas comuns (sem trocas gasosas) para as variáveis analisadas (Figura 6). Porém, o tamanho médio de brotos e número médio de folhas foram afetados quanto ao uso de AIB e carvão ativado, apresentando maiores tamanhos na presença destes.

O número de brotos oxidados aumentou em tratamentos sem carvão ativado, bem como naqueles com AIB (Figura 6). O carvão ativado possui características físicas que permitem a maior absorção de algumas substâncias, fazendo efeito de antioxidante através da adsorção irreversível de compostos tóxicos e diminuindo o acúmulo de exsudatos, assim como aumentando a disponibilidade de vitaminas e melhorando o efeito de alguns fitorreguladores ao longo do tempo de cultivo fazendo com que o crescimento e desenvolvimento das plantas seja favorecido (Thomas, 2008).

Apesar do pequeno aumento no tamanho de brotos promovido pelo uso de AIB quanto combinado ao carvão ativado, sugere-se não utilizar o AIB nesta fase, devido ao maior custo de produção, não sendo justificado seu uso, uma vez que este tratamento não se diferiu do tratamento em que foi utilizado apenas com carvão ativado e pelas demais razões apresentadas anteriormente.



**Figura 6:** Tamanho Médio de Brotos (mm), Número Médio de Folhas e Porcentagem de brotos de morangueiro cv. Pirquinque obtidos por meio da utilização de AIB (0 ou 5  $\mu\text{m}$ ), carvão ativado (0 e 1,5  $\text{g.L}^{-1}$ ) e tampas com e sem trocas gasosas. TN= Tampa sem trocas gasosas, 0  $\mu\text{m}$  de AIB e 0  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado; TN+C= Tampa sem trocas gasosas, 0  $\mu\text{m}$  de AIB e 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado; TN+C+AIB= Tampa sem trocas gasosas, 5  $\mu\text{m}$  de AIB e 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado; TB= Tampa com trocas gasosas, 0  $\mu\text{m}$  de AIB e 0  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado; TB+C= Tampa com trocas gasosas, 0  $\mu\text{m}$  de AIB e 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado; TB+C+AIB= Tampa com trocas gasosas, 5  $\mu\text{m}$  de AIB e 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado. A barra de erros representa o intervalo de confiança a 95%.

## Conclusões

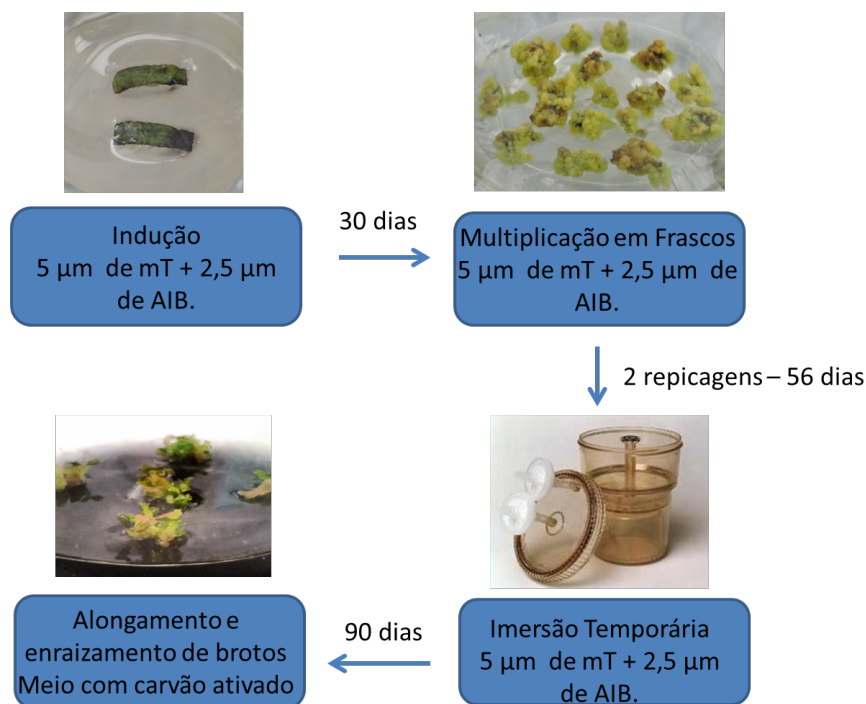
A indução de culturas semelhantes a culturas nodulares de morangueiro através da utilização de metatopolina foi eficiente, justificando o uso deste fitorregulador, uma vez que são relatados na bibliografia com menor probabilidade de variações somaclonais quando comparado aos demais fitorreguladores utilizados na micropropagação de morangueiro.

A formulação salina MS com metade da concentração (meia força) aparentemente causa deficiências nutricionais nas plantas; as mesma apresentando folhas e caules com coloração de vermelha a roxa.

O uso de carvão ativado se torna importante para a formação de raízes e evita que ocorra a oxidação de brotos durante a fase de alongamento e enraizamento de morangueiro.

Devem ser estudadas as influências das tampas do tipo Biossama (com trocas gasosas) durante a fase de aclimatização, pois durante a fase de alongamento e enraizamento de brotos ela não se diferiu estatisticamente das tampas sem trocas gasosas.

O protocolo sugerido neste trabalho para as fases de indução, multiplicação, alongamento e enraizamento de brotos de micropropagação de morangueiro está representado na figura 7.



**Figura 7:** Fluxograma do protocolo de micropropagação de morangueiro sugerido.

## Referências Bibliográficas

AMOO, S. O.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J.. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. **Plant Growth Regul**, [s.l.], v. 63, n. 2, p.197-206, 22 ago. 2010. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10725-010-9504-7.

ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J.. **Sistema de Produção do Morango**: Produção de mudas. 2005. Embrapa Clima Temperado. Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap01.htm>>. Acesso em: 28 out. 2014.

ADAK, N. et al. The effect of various hormone types on in vitro propagation of strawberry. **Acta Hortic.**, [s.l.], n. 829, p.305-308, jun. 2009. International Society for Horticultural Science (ISHS). DOI: 10.17660/actahortic.2009.829.46

AREMU, A. O. et al. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell Tiss Organ Cult**, p.1-16, jul. 2011

BHANKHER, A. K. et al. Micropropagation of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.). **Haryana J. Hortic. Sci.** p. 214-216. jan. 2008.

DALAGNOL, G. L.. **Caracterização da variação genética e epigenética em plantas de macieira e morangueiro obtidas por meio de propagação vegetativa convencional e micropropagação**. 2010. 158 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DAL VESCO, L. L. et al. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 128, n. 4, p.515-522, maio 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.scienta.2011.02.018. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0304423811000872?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 07 out. 2015.

DEBNATH, S. C.. Developing a scale-up system for the in vitro multiplication of thidiazuron-induced strawberry shoots using a bioreactor. **Canadian Journal Of Plant Science**, p. 737-746. mar. 2008.

DIAS, M. S. C. et al. Cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte - Mg, v. 35, n. 279, p.39-47, mar./abr. 2014.

FACHINELLO, J. C. et al. SITUAÇÃO E PERSPECTIVAS DA FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO NO BRASIL. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, São Paulo, volume especial, p.109-120, out. 2011.

GRATTAPLAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte II, p.183-260.

GRIMALDI, F. et al. Enraizamento in vitro de frutíferas da família Rosaceae. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 7, n. 2, p.160-168, nov. 2008.

HANHINEVA, K.; KOKKO, H. ; RENLAMPI, S. K.. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, n. 41, p.826-831, nov./dez. 2005.

HOFFMANN, A.; BERNARDI, J.. **Produção de Morangos no Sistema Semi-Hidropônico**: Introdução. 2006. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MorangoSemiHidropnico/introducao.htm>>. Acesso em: 28 out. 2014.

MOHAMED, F. H. et al. High frequency, direct shoot regeneration from greenhouse-derived leaf disks of six strawberry cultivars. **Pakistan Journal Of Biological Sciences**. Faisalabad, Pakistan, p. 96-101. 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG F.A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, n. 15, p. 473-497, 1962.

NESI, C. N.; VERONA, L. A. F. & GROSSI, R. A produção de morangos em Santa Catarina no ano de 2006 In: IV Simpósio Nacional do Morango e III Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do MERCOSUL, 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.100, 2008.

NEHRA, N. S.; STUSHNOFF, C.; KARTHA, K. K.. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria X ananassa*). **Plant Science**. ..., p. 119-126. ago. 1990.



OMAR, G. F. et al. Somatic embryo-like structures of strawberry regenerated in vitro on media supplemented with 2,4D and BAP. **Indian Journal Of Experimental Biology**, p. 739-745. jun. 2013.

PEREIRA, J. E. S. et al. ENRAIZAMENTO IN VITRO DO MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* Duchesne) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, jan./mar. 1999. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84781999000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781999000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 25 out. 2015.

RODAS, C. L.. **Deficiências nutricionais no morangueiro: caracterização de sintomas visuais, produção e nutrição mineral**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008. Cap. 2.

RODAS, C. L.. **Nitrogênio e Potássio via fertirrigação na produção do morangueiro**. 2011. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SCHERER, R. F. et al. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 151, p.38-45, fev. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.scienta.2012.11.027. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0304423812005560?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 26 out. 2015.

SHAKILA, S. et al. Micropropagation of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) A newly introduced crop in Bangladesh. **American-eurasian Journal Of Scientific Research**. p. 151-154. Janeiro, 2007.

SILVEIRA, G. S. R.; GUIMARÃES, B. C.. Aspectos sociais e econômicos da cultura do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte - Mg, v. 35, n. 279, p.7-10, mar./abr., 2014.

STRNAD, M. et al. Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench., cv robusta). **Phytochemistry**, p. 213-218. jan. 1997.

TAIZ, L.; ZIEGER, E.. Nutrição mineral. In: TAIZ, L.; ZIEGER, E.. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. Cap. 5.

THOMAS, T. D.. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 26, n. 6, p.618-631, nov. 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0734975008000864?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 26 out. 2015.

ZHANG, Q.; FOLTA, K. M.; DAVIS, T. M.. Somatic embryogenesis, tetraploidy, and variant leaf morphology in transgenic diploid strawberry (*Fragaria vesca* subspecies *vesca* ‘Hawaii 4’). **BMC Plant Biol**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.23, 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1186/1471-2229-14-23.

WERBROUCK, S. P. O. et al. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? **Physilogia Plantarum**, p. 291-297. 1996.